

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年8月28日 (28.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/070754 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 5/12, C12N 9/99, A61K 38/00, A61P 17/00, 31/00, 35/00, 37/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01859

(22) 国際出願日: 2003年2月20日 (20.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-44000 2002年2月20日 (20.02.2002) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 吉田 稔 (YOSHIDA, Minoru) [JP/JP]; 〒334-0059 埼玉県川口市安行655-2-1 Saitama (JP). 西野 憲和 (NISHINO, Norikazu) [JP/JP]; 〒808-0104 福岡県北九州市若松区島田1-6-6 Fukuoka (JP). 堀之内 末治 (HORINOUCHI, Sueharu) [JP/JP]; 〒135-0044 東京都江東区越中島1-3-1 6-4 0 3 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

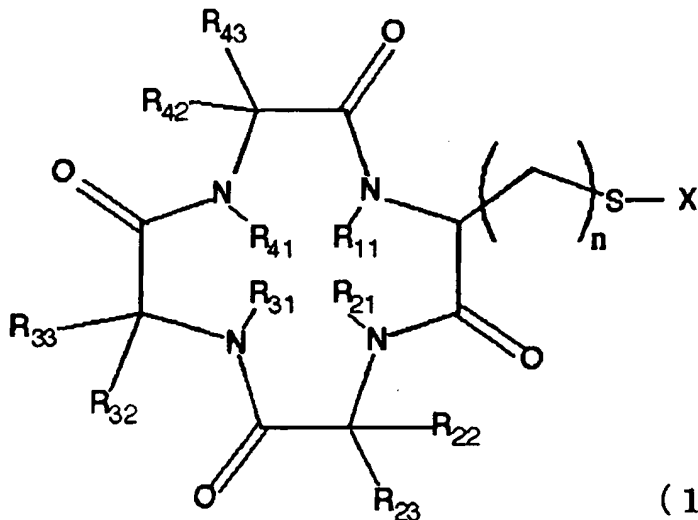
(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤およびその製造方法



(57) Abstract: Compounds represented by the following general formula (1) have a potent activity of selectively inhibiting HDAC1,4. Thus, these compounds are useful as drugs for preventing or treating diseases caused by HDAC1,4. (1)

(1)

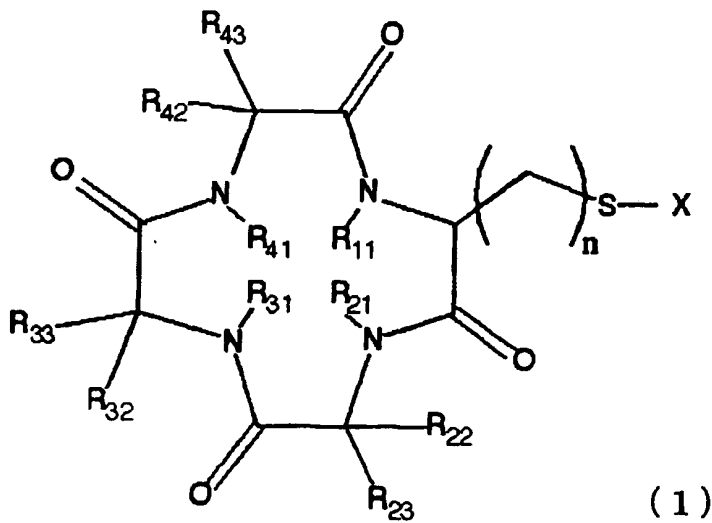


WO 03/070754 A1



(57) 要約:

一般式 (1) で示される化合物は、HDAC1, 4 に対して選択的に強い阻害活性を備えている。そのため、本発明の化合物は HDAC1, 4 に起因した疾患の治療または予防のための薬剤として有用となる。



- 1 -

明細書

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤およびその製造方法

技術分野

本発明はヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase:HDAC) 阻害剤およびその製造方法に関する。

背景技術

真核生物のクロマチン構造と遺伝子の発現は、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) によるヒストンのアセチル化と、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による脱アセチル化によって調節されている。HDAC の阻害剤ががん細胞の分化や、アポトーシスを誘導することが以前から知られ、制がん剤としての応用が期待されている (Marks, P. A., Richon, V. M., and Rifkind, R. A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1210-1216; Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* 17, 423-430; Bernhard, D., Löffler, M., Hartmann, B. L., Yoshida, M., Kofler, R., and Csordas, A. (1999). Interaction between dexamethasone and butyrate in apoptosis induction: non-additive in thymocytes and synergistic in a T cell-derived leukemia cell line. *Cell Death Diff.* 6, 609-607)。

実際、米国では動物実験で制がん剤としての有効性を示すいくつかの HDAC 阻害剤 (Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1998). FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone d

acetylase inhibitor. *Exp. Cell Res.* 241, 126-133; Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., and Nakanishi, O. (1999). A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4592-4597)の臨床研究が開始されている。

HDAC 特異的阻害剤としてはトリコスタチン A (TSA) が有名である (Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174-17179)。実際、TSA は白血病細胞、神経細胞、乳癌細胞などの分化を誘導することが知られている (Yoshida, M., Nomura, S., and Beppu, T. Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 47: 3688-3691, 1987; Hoshikawa, Y., Kijima, M., Yoshida, M., and Beppu, T. Expression of differentiation-related markers in teratocarcinoma cells via histone hyperacetylation by trichostatin A. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1491-1495, 1991; Minucci, S., Horn, V., Bhattacharyya, N., Russanova, V., Ogryzko, V. V., Gabrielle, L., Howard, B. H., and Ozato, K. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11295-11300, 1997; Inokoshi, J., Katagiri, M., Arima, S., Tanaka, H., Hayashi, M., Kim, Y. B., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Omura, S. (1999). Neuronal differentiation of Neuro 2a cells by inhibitors of cell progression, trichostatin A and butyrolactone I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 372-376; Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R. L., and Liu, J. M. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML

- 3 -

1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 59: 2766-2769, 1999; Munster, P. N., Troso-Sandoval, T., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. A., and Richon, V. M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 61: 8492-8497, 2001; Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 61: 2-7, 2001; Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., and Heinzl, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20: 6969-6978, 2001)。さらに HDAC 阻害剤とは異なる機構で遺伝子発現を活性化する薬物との併用によって、その分化誘導作用やアポトーシス誘導作用は相乗的に増大することも知られている。例えば、核内受容体であるレチノイン酸受容体を活性化し、分化に関する遺伝子発現を引き起こすレチノイン酸と HDAC 阻害剤との併用でがん細胞の分化が促進される (Minucci, S., Horn, V., Bhattacharyya, N., Russanova, V., Ogryzko, V. V., Gabriele, L., Howard, B. H., and Ozato, K. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11295-11300, 1997; Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 61: 2-7, 2001; Coffey, D. C., Kutko, M. C., Glick, R. D., Butler, L. M., Heller, G., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M., and La Quaglia, M. P. The h

- 4 -

istone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res.* 61: 3591-3594, 2001; Petti, M. C., Fazi, F., Gentile, M., Diverio, D., De Fabritiis, P., De Propriis, M. S., Fiorini, R., Spiriti, M. A., Padula, F., Pelicci, P. G., Nervi, C., and Lo Coco, F. Complete remission through blast cell differentiation in PLZF/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo studies. *Blood* 100: 1065-1067, 2002)。また、多くのがん細胞ではがん抑制遺伝子の発現が低下しているが、その原因として知られるDNAのメチル化を阻害する5-アザデオキシシチジンとの併用によってがん抑制遺伝子の発現の回復とがん細胞のアポトーシスが促進される (Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389, 1998; Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet.* 21: 103-107, 1999; Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B., Kim, H. M., Kim, W. J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S. C., and Ito, Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109: 113-124, 2002; Boivin, A. J., Momparler, L. F., Hurtubise, A., and Momparler, R. L. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 13: 869-874, 2002; Primeau, M., Gagnon, J., and Momba

rler, R. L. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 103: 177-184, 2003)。

HDAC 阻害剤は、制がん剤としてのみならず、がん予防薬としても期待されている。TSA や SAHA 等は、動物の化学発がんモデルにおいて乳癌の発生を顕著に抑制した。また、バルプロ酸を用いた研究から、HDAC 阻害剤は転移を抑制することも示されている (Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., and Heinzl, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20: 6969-6978, 2001)。

HDAC 阻害剤は制がん剤以外にも、例えば自己免疫疾患、皮膚病、感染症 (Darvin-Rattray et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13143-13147, 1996) などの治療・改善薬、さらには遺伝子治療におけるベクター導入の効率化 (Dion et al., *Virology* 231, 201-209, 1997)、導入遺伝子の発現亢進 (Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5798-5803, 1997) など様々な応用も試みられている。また、HDAC 阻害剤は血管新生阻害作用を有すると考えられている (Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J. E., Lee, S. W., Moon, E. J., Kim, H. S., Lee, S. K., Chung, H. Y., Kim, C. W., and Kim, K. W. (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Med.* 7, 437-443; Kwon, H. J., Kim, M. S., Kim, M. J., Nakajima, H., and Kim, K. W. (2002). Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 97, 290-296)。

HDAC には 10 種類以上のサブタイプが存在するが、近年、特定の HDAC サブタイプとがんとの密接な関係がわかってきた。例えば、発がんの抑制に極めて重要

な役割を果たすがん抑制遺伝子 p53 の機能発現に p53 自身のアセチル化が重要であり (Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M. H., Appella, E., and Yao, T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* 20, 1331-1340)、その機能阻害に HDAC1 や HDAC2 が関わること (Juan, L. J., Shia, W. J., Chen, M. H., Yang, W. M., Seto, E., Lin, Y. S., and Wu, C. W. (2000). Histone Deacetylases Specifically Down-regulate p53-dependent Gene Activation. *J. Biol. Chem.* 275, 20436-20443)、前骨髄球性白血病 (APL) の発症に関わる蛋白質 PML-RAR や PLZF-RAR、リンパ腫の発症に関わる Bcl-6 等のがん遺伝子が、核内コリプレッサーを介して HDAC4 などをリクルートし、正常な分化に必要な遺伝子群の発現を抑制することで発がんに至ることなどが示されている (Dhordain P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Leprince, D. (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10762-10767; Grignani, F., De, M. S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M. A., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-818; He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A., and Pandolfi, P. P. (1998). Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nature Genet.* 18, 126-135; Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. J., and Evans, R. M. (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 811-814)。その一方で、組織特異的に発現する HDAC サブタイプ

の中には、正常な組織の発生や分化に重要な役割を果たすものが存在することが知られ(McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J., and Olson, E. N. (2000). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111; Verdell, A., and Khochbin, S. (1999). Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J. Biol. Chem.* 274, 2440-2445)、これらを阻害しないためにはサブタイプ特異的な阻害剤の開発が必要であると考えられる。

HDAC6 は核外輸送によって核-細胞質間をシャトルし、通常は細胞質に局在する酵素である (Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.-P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* 10, 747-749)。HDAC6 は精巣などで発現が高く、正常な組織の分化に関わると推定される。また、HDAC6 は微小管の脱アセチル化に関与し、微小管の安定性を制御することが知られている (Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 21, 6820-6831)。さらに、HDAC6 は微小管に結合する脱アセチル化酵素で、細胞の運動性に関与する (Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458)。よって HDAC6 の阻害剤は転移抑制剤となる可能性がある。TSA は各 HDAC サブタイプをほぼ同等に強く阻害するが、環状テトラペプチド構造を有し、活性基としてエポキシケトンを持つトラポキシンは HDAC6 を阻害することができない (Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and Hori

nouchi, S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 87-92, 2001.)。酵素の立体構造の情報から、環状テトラペプチドはあまり保存されていない酵素の活性中心の外側と相互作用するため、環状テトラペプチド部分の構造によってHDAC6との結合性が低いと推定される。このことは環状テトラペプチド部分の改変によって様々なHDACに選択的な阻害剤を創製できる可能性があることを示している。

TSAはヒドロキサム酸基がHDAC活性ポケット内で亜鉛に配位することで阻害活性を示す(Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., and Pavletich, N. P. Structure of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. Nature 401: 188-193, 1999.)。ヒドロキサム酸を有するHDAC阻害剤としては、Oxamflatin(Kim, Y. B., Lee, K.-H., Sugita, K., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. Oncogene 18: 2461-2470, 1999.)、CHAP(Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 87-92, 2001., Komatsu, Y., Tomizaki, K.-y., Tsukamoto, M., Kato, T., Nishino, N., Sato, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Hayashi, H. Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. Cancer Res. 61: 4459-4466, 2001.)なども知られている。しかし、TSAは血中で不安定である上にヒドロキサム酸のキレート作用が強力なために他の必須な金属イオンとキレートを形成してしまうなどの理由で、ヒドロキサム酸を有するHDAC阻害剤はこれまでのところ抗がん剤として実

際の使用には至っていない。これに対し、最近になってFK228のジスルフィド結合の還元により生じるチオール基が、HDAC活性ポケット内の亜鉛と配位する活性基となり、HDACを阻害し得ることが示された。このようにFK228は、細胞内の還元力で還元されて活性化するプロドラッグである (Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (2002). FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* 62, 4916-4921)。

また、天然界から環状テトラペプチド構造を有し、活性基としてエポキシケトンを持つHDAC阻害剤が複数単離されている。このような知見から、酵素認識に対する環状テトラペプチド構造の有用性が示唆されているが(前掲Yoshidaら, 1995)、これまでの阻害剤は安定性などの種々の点で医薬品として十分に満足できるレベルには達したものはない。そこでそれらの問題点を解決した薬剤の開発が強く望まれている。

発明の開示

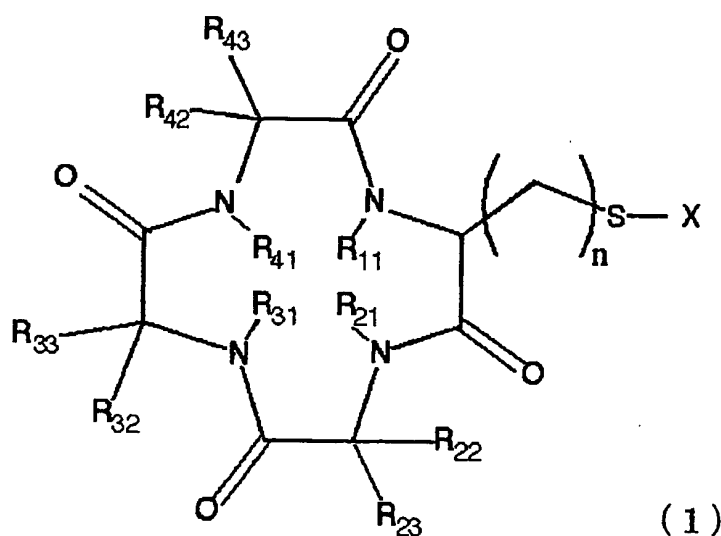
そこで、本願発明者らは、環状テトラペプチド構造を有する新規なHDAC阻害剤およびその製造方法を提供することを目的とする。

上記課題に鑑み、本願発明者らは、チオール基およびそのジスルフィド結合を有する環状テトラペプチド構造を有する化合物を合成し、そのHDAC阻害活性を解析した結果、ジスルフィド結合を有する化合物は *in vitro* では酵素に対してはさほど強いHDAC阻害活性を示さないが、還元剤であるジチオスレイトールを共存させてチオール体とすると強いHDAC阻害活性を有することが確認された。一方、細胞レベルでのジスルフィド体の活性はTSAやチオール体と同様の強い活性が観察された。すなわち、ジスルフィド体は細胞内に取り込まれた後、細胞内還元でジスルフィド結合が開裂して強い活性が誘導されるHDAC阻害剤のプロド

ラッグとして有用であることが示された。また、このようにチオール基を保護することにより化合物の血清中での安定性が増すとともに、保護基 (-SX) に様々な機能化合物を結合させることにより、HDAC 阻害剤以外にも所望の活性を発揮し得る化合物を連結し得る化合物であることを見出した。

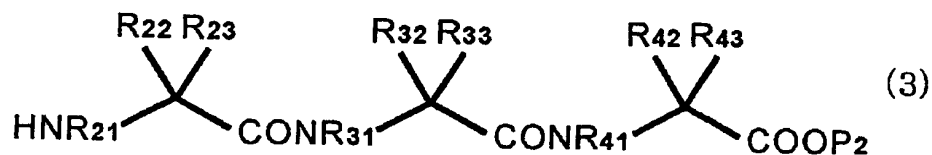
即ち、本発明は、HDAC 阻害剤およびその製造方法に関し、以下の〔1〕～〔9〕を提供するものである。

〔1〕 以下の一般式 (1) で示される化合物。

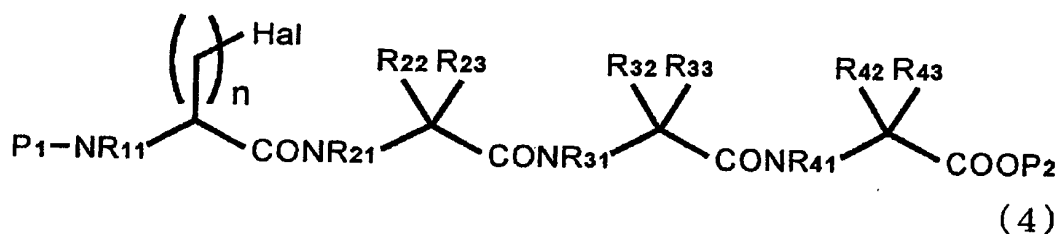


〔式中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} はそれぞれ独立して水素、炭素数 1~6 の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数 1~6 の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数 1~5 の直鎖アルキレン基、炭素数 1~6 の分岐鎖を有する鎖長炭素数 1~5 の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数 1~6 の環構造を備えた鎖長炭素数 1~5 の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を示す。X は、水素、当該 X よりも

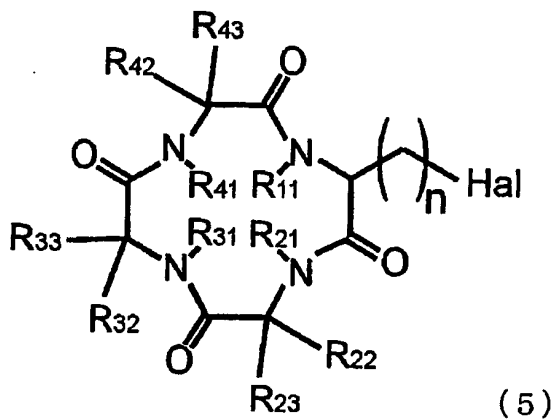
- 12 -



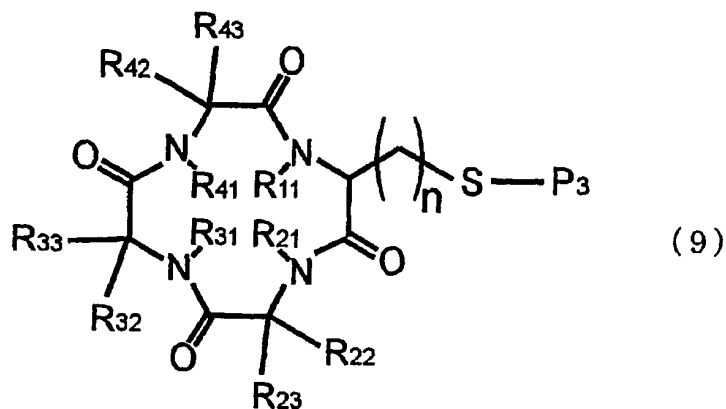
(式中、 R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , 及び R_{43} は、一般式 (1) で定義したと同様であり、 P_2 はカルボキシル基の保護基を表す) で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式 (4)



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を得、次いで前記一般式 (4) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させ、一般式 (5)



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を得るか、または一般式 (6)



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , 及び R_{43} は、前記で定義したと同様であり、 P_3 はスルフィドリル基の保護基を表す) で示される化合物を得、次いで一般式 (9) で示される化合物をアンモニアまたは他のアミン類及び酸化剤で処理することを含む、[1] 記載の化合物の製造方法。

以下、本発明の実施の形態について図面に基づき詳細に説明する。

本発明の化合物は、上記の一般式 (1) で示すことができる。このような化合物は HDAC 阻害剤として使用できる。

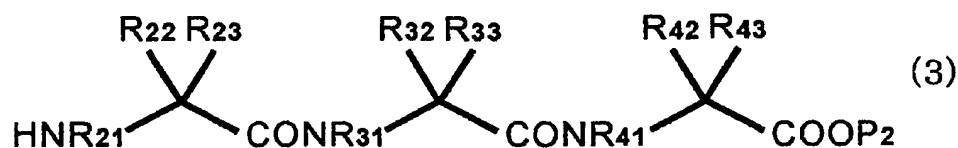
上記式 (1) 中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基とすることができる。また、 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} は、それぞれ独立して水素、炭素数 1~6 の直鎖アルキル基、または非芳香族環状アルキル基のいずれかとすることができ、ここで、炭素数 1~6 の直鎖アルキル基および非芳香族環状アルキル基には、非芳香族環状アルキル基、芳香環もしくは置換基を有する芳香環が結合していてもよい。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造をとってもよく、また鎖長炭素数 1~5 の直鎖アルキレン基、炭素数 1~6 の分岐鎖を有する鎖長炭素数 1~5 の直鎖アルキレン基、もしくは炭素数 1~6 の環構造を備えた鎖長炭素数 1~5 の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を形成していてもよい。この環状テトラペプチド構造部分は HDAC のポケットをふさぐキャップとして機能し得ると考え

られるため、このキャップ構造として機能し得る範囲で、上記炭素数1~6の直鎖アルキル基、芳香族環状アルキル基、これらの置換基となり得る芳香族を任意に選択することができる。

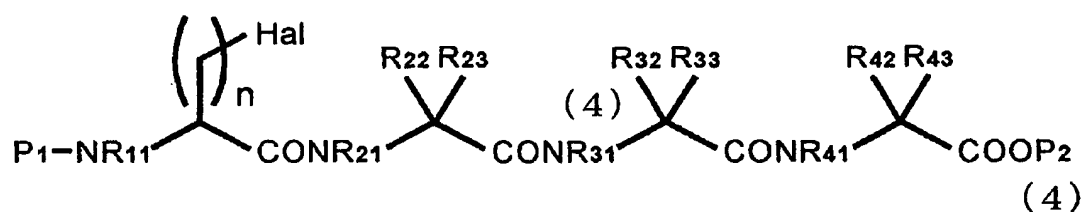
また、式(1)中、Xを水素とし、隣り合う硫黄原子とともに直接HDAC阻害活性を示すチオール基を形成させてもよい。ただし、Xを水素とし、チオール基を露出させた場合には、生体内で不安定となる。そのため、Xを水素とした場合には、ドラッグデリバリーシステムなどのように所望の部位まで安定に輸送し得る手段と組み合わせることが好ましい。また、HDAC阻害活性を有するチオール基の安定性を高めるために、Xには生体内で代謝され、生体に有害でない置換基を用いることが好ましい。このような置換基としては、当該Xと隣り合う硫黄原子とジスルフィド結合を形成し得る硫黄原子を備えた置換基とすることが好ましく、置換基自身で何らかの効能を示すものであってもよく、また、単に保護基としての機能を備えているものであってもよい。このような硫黄原子を含む置換基としては、当該Xよりも左に示す構造体と同一構造体、硫黄原子を含む任意の構造体であって当該硫黄原子と上記式(1)中の硫黄原子とジスルフィド結合を介して結合し得るアルキル基もしくはアリール基、または前記 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{32} 、 R_{33} 、 R_{42} 、または R_{43} の末端に結合し該Xの左に位置する硫黄原子と分子内ジスルフィド結合を形成している硫黄原子などとすることができる。ここで、置換基を当該Xよりも左に示す構造体と同一構造体とした場合には、ダイマー構造となり、生体内における代謝によりジスルフィド結合が切断されて、2分子の活性を有するHDAC阻害剤が遊離することになる。また、硫黄原子を有する任意のアルキル基もしくはアリール基は、さらに置換基などを備えていてもよく、また、HDAC阻害剤と同じあるいは異なる効能を発揮し得る構造体としてもよい。

本発明においては、例えば、メチルメルカプタン、ベンジルメルカプタン、シクロヘキシルメルカプタン等のアルキルメルカプタンおよびチオフェノール、メルカプトピリジン等の芳香族メルカプタンに加え、5-アザデオキシシチジンやレ

- 17 -

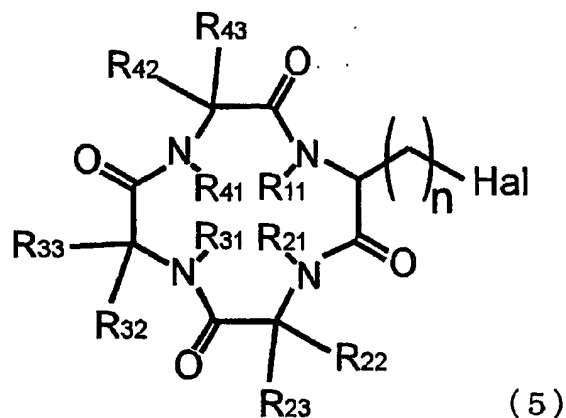


で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式 (4)

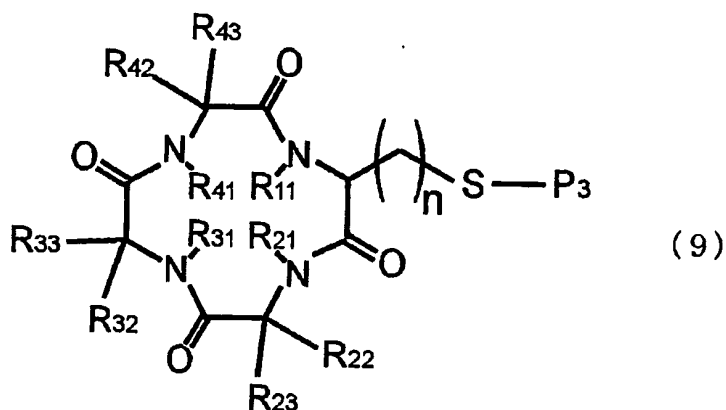


で示される化合物を得る。これら式中、Hal は塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子のいずれかのハロゲン原子、または同様に良い脱離基となるアリルまたはアルキルスルフォキシ基のいずれを用いてもよく、P₂ はアミノ基の保護基を表す。

次いで前記一般式 (4) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、P₁ 及び P₂ を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させ、一般式 (5)

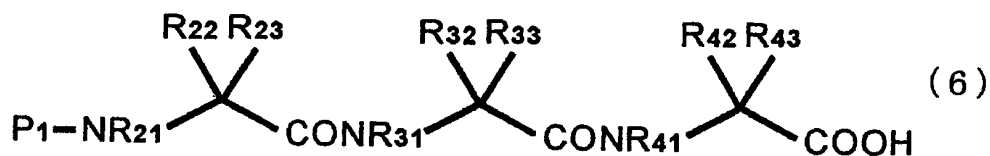


で示される化合物を得る。次いで、一般式 (5) で示される化合物を、硫黄原子を含む試薬と反応させ、一般式 (9)

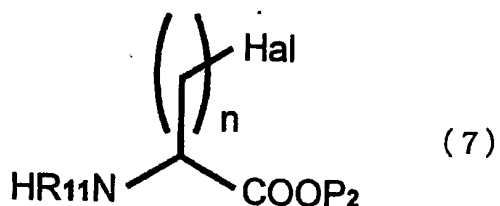


で示される化合物を得、次いで一般式 (9) で示される化合物をアンモニアまたは他のアミン類及び酸化剤で処理することにより、ジスルフィド結合を有するプロドラッグ型の化合物 (ダイマー型、ハイブリッド型) が形成される。なお、式 (9) 中、 P_3 はスルフィドリル基の保護基を表す。これを活性を有するチオール型の化合物に分離するには、還元剤またはジスルフィド結合を消化し得る酵素により処理すればよい。

本発明の化合物の製造方法の第二の態様は、2-アミノ-n-ハロアルカン酸のカルボキシル基に保護基 P_2 を備えた以下の一般式 (7) を原料として製造する方法である。具体的には、一般式 (6)



で示される化合物を、一般式 (7)



で示される化合物とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式 (8)

- 20 -

., and Beppu, T. Expression of differentiation-related markers in teratocarcinoma cells via histone hyperacetylation by trichostatin A. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1491-1495, 1991; Minucci, S., Horn, V., Bhattacharyya, N., Russanova, V., Ogryzko, V. V., Gabriele, L., Howard, B. H., and Ozato, K. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11295-11300, 1997; Inokoshi, J., Katagiri, M., Arima, S., Tanaka, H., Hayashi, M., Kim, Y. B., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Omura, S. (1999). Neuronal differentiation of Neuro 2a cells by inhibitors of cell progression, trichostatin A and butyrolactone I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 372-376; Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R. L., and Liu, J. M. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 59: 2766-2769, 1999; Munster, P. N., Troso-Sandoval, T., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. A., and Richon, V. M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 61: 8492-8497, 2001; Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 61: 2-7, 2001; Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., and Heinzl, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20: 6969-6978, 2001)。よって、本発明の化合物は、アポトーシス誘導剤、分化誘導剤、およびがん転移抑制剤として利用できる

。また、HDACを阻害する化合物は、血管新生を阻害すると予想されている (Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J. E., Lee, S. W., Moon, E. J., Kim, H. S., Lee, S. K., Chung, H. Y., Kim, C. W., and Kim, K. W. (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Med.* 7, 437-443; Kwon, H. J., Kim, M. S., Kim, M. J., Nakajima, H., and Kim, K. W. (2002). Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 97, 290-296)。よって、本発明の化合物は、血管新生阻害剤としても利用できる。

また、本発明の化合物は、種々のHDACのうち、HDAC 1, 4に対して選択的に強い阻害活性を示す。そのため、本発明の化合物は、HDAC 1, 4に起因した疾患の治療または予防のための薬剤として有用になる。この疾患としては、がん以外にも、HDAC 1, 4が関与した自己免疫疾患、皮膚病、感染症などを含めることができる。また、本発明の化合物は、上記疾患の治療または予防のための薬剤への応用だけでなく、遺伝子治療におけるベクター導入の効率化、導入遺伝子の発現亢進などのような遺伝子治療の補助剤あるいは促進剤として応用してもよい。

また、本発明の化合物はレチノイン酸やDNAメチル化阻害剤と併用することができる。本発明は、このような併用剤もまた提供するものである。

本発明の化合物を製剤化する場合には、必要に応じて充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いることができる。また、この医薬製剤中に着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を医薬製剤中に含有させてもよい。この医薬製剤としては各種の形態が治療目的または予防目的に応じて選択でき、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロ

- 22 -

ースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

また、注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80™、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。非経口投与の剤型としては、例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により投与しうる。

本発明の化合物を非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、通常、1日当り約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与する

のが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重 60kg 当りに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

また、本発明の化合物を経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば通常成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 100 μ g から 20mg であると考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、活性基であるチオール基までの炭素鎖数 5 の LDLD 体あるいは LDLL 体の SCOP の構造の一覧を示す図である。

図 2 は、活性基であるチオール基までの炭素鎖数 4～7 の SCOP の構造を示す図である。なお、図において SCOP152 (C5) は、図 1 と重複して示す。

図 3 は、ホモダイマー型の SCOP の構造を示す図である。なお、SCOP 番号はモノマーの番号を 2 倍して表示している。

図 4 は、SCOP 152 に種々の化合物を結合させたハイブリッド型の SCOP の構造を示す図である。

図 5 は、天然の Cyl-1, Cyl-2 は立体コンフォメーションを示す図である。

図 6 は、細胞内でのヒストンアセチル化レベルを抗アセチル化リジン抗体を用いたウエスタンにより測定した結果を示す写真である。

図 7 は、SCOP 152、SCOP 304 および SCOP 402 の血清中での安定性の評価を行った結果を示す図である。

図 8 は、SCOP 152、SCOP 304 および SCOP 402 の細胞レベルでの安定性の評価を行った結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

本実施例で示す化合物の合成工程の全体の流れを図 1、2 に示し、H-L-Ab7-OH を出発原料として各合成工程について以下に詳細に説明する。なお、ここでは

2-amino-7-bromoheptanoic acid を「Ab7」と、2-amino-7-acetyltioheptanoic acid を「Am7(Ac)」と、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid を「Am7」と、sulfide of 2-amino-7-mercaptoheptanoic acid を「Am7(-)」と、2-amino-8,9-dimercapto(S^9 -2'-nitro- N,N' -dimethyl benzamide) を「Am7(E11)」と、2-amino-8,9-dimercapto-11-hydroxyundecanoic acid を「Am7(SMEt)」と、2-amino-8,9-dimercapto(S^9 -2'-pyridyl) nonanoic acid を「Am7(S2Py)」と、2-amino-8,9-dimercapto(S^9 -4'-pyridyl) nonanoic acid を「Am7(S4Py)」と、2-amino-8,9-dimercaptodecanoic acid を「Am7(SMe)」と略す。また、合成化合物である Sulfur-containing cyclic peptides を「SCOP」と略して示す。

実施例 1. Boc-L-Ab7-OH の合成

H-L-Ab7-OH (7.3 g, 32.4 mmol) を水 : ジオキサン = 1 : 1 溶液 (30 ml, v/v) に溶解し、氷冷下 $(Boc)_2O$ (7.68 g, 35.6 mmol) 及びトリエチルアミン (6.72 ml, 48.6 mmol) を加え 5 時間攪拌した。反応液を留去後、エーテルで洗い、水相をクエン酸で酸性にして酢酸エチルで逆抽出した。 $MgSO_4$ で乾燥後、酢酸エチルを留去し、減圧下乾燥後に油状の標記化合物 (10.4 g, 32.4 mmol, 収率 100%) を得た。

実施例 2. Boc-L-Ab7-NHMe の合成

Boc-L-Ab7-OH (326 mg, 1.0 mmol), 塩酸モノメチルアミン (81 mg, 1.2 mmol), $HOBt \cdot H_2O$ (184 mg, 1.2 mmol) の DMF (3 ml) 溶液に氷冷下でトリエチルアミン (0.17 ml, 1.2 mmol) 及び DCC (247 mg, 1.2 mmol) を加えた。15 時間攪拌後、DMF を留去し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。 $MgSO_4$ で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (3.6 x 15 cm, クロロホルム) で精製し、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、白色粉末の標記化合物 (250 mg, 0.74 mmol, 収率 74%) を得た。TLC: $R_f = 0.58$ ($CHCl_3$ / MeOH = 9 / 1)

実施例 3. Boc-L-Am7(Ac)-NHMe の合成

Boc-Ab7-NHMe (125 mg, 0.37 mmol) の DMF (2 ml) 溶液に、チオ酢酸カリウム (64 mg, 0.56 mmol) を加えて 3 時間反応させた。DMF を留去し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した後、MgSO₄ で乾燥、濃縮、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、白色粉末の標記化合物 (120mg, 0.36 mmol, 収率 97%) を得た。TLC: R_f = 0.57 (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 4. Boc-L-Am7(-)-NHMe SS dimer の合成

Boc-Am7(Ac)-NHMe (60 mg, 0.18 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (20 eq.) を加え、24 時間攪拌した。反応液を濃縮後、生成した SS dimer をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1.5×30 cm, 1% メタノール / クロロホルム) で精製し、白色粉末の標記化合物 (43 mg, 0.11 mmol, 収率 61%) を得た。HPLC 保持時間、8.5 min, HRMS (FAB, dithiodiethanol), 579.3293 [M+H], C₂₆H₅₁O₆N₄S₂ (579.3250).

実施例 5. Boc-L-Am7(S4Py)-NHMe の合成

Boc-Am7(Ac)-NHMe (60 mg, 0.18 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液に 4,4'-ジチオジピリジン (79 mg, 0.36 mmol) 及びメタノール性アンモニア (20 eq.) を加え、5 時間攪拌した。反応液を濃縮後、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1.5×30 cm, クロロホルム) で精製し、凍結乾燥を行い、標記化合物 (43 mg, 0.11 mmol, 収率 61%) を得た。HPLC 保持時間、5.6 min, HRMS (FAB, dithiodiethanol), 400.1766 [M+H], C₁₈H₂₉O₃N₃S₂ (400.1729).

実施例 6. Boc-L-Ab7-OBzl の合成

Boc-L-Ab7-OH (4.05 g, 12.5 mmol) を DCM (20 ml) に溶解し、氷冷下ベンジルアルコール (1.55 ml, 15.0 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン (153 mg, 1.25 mmol) 及び DCC (3.09 g, 15.0 mmol) を加え 8 時間攪拌を行った。反応液を留去後、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水

- 26 -

溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (5×20 cm, 20% 酢酸エチル / ヘキサン) で精製し、油状の標記化合物 (4.29 g, 10.4 mmol, 収率 83%) を得た。TLC: Rf = 0.49 (酢酸エチル / ヘキサン = 1 / 4)

実施例 7. Boc-L-Ile-L-Pro-OBzl の合成

Boc-L-Pro-OH (1.08 g, 5.0 mmol) とベンジルプロミド (0.893 ml, 75 mmol) とを DMF (10 ml) 中、氷冷下でトリエチルアミン (10.5 ml, 75 mmol) 存在下で反応させて、生じた Boc-L-Pro-OBzl を油状物として得た。これを氷冷下 2 N HCl / ジオキサン (5 eq.) で 3 時間反応させて、H-L-Pro-OBzl · HCl を得た。

Boc-L-Ile-OH · 1/2 H₂O (1.39 g, 6.0 mmol), H-D-Pro-OBzl · HCl (956 mg, 4.0 mmol) 及び HOBt · H₂O (613 mg, 4.0 mmol) の DMF (10 ml) 溶液に氷冷下で DCC (1.24 g, 6.0 mmol) 及びトリエチルアミン (0.70 ml, 4.0 mmol) を加えた。8 時間攪拌後、DMF を留去し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、油状の標記化合物 (1.63 g, 3.38 mmol, 収率 85%) を得た。TLC: Rf = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 8. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OBzl の合成

Boc-L-Ile-L-Pro-OBzl (1.63 g, 3.38 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ile-L-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (8 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-OH (1.50 g, 5.07 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.92 g, 5.07 mmol), HOBt · H₂O (518 mg, 3.38 mmol) 及びトリエチルアミン (2.37 ml, 16.9 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール)

- 27 -

ール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.44 g, 2.42 mmol, 収率 72%) を得た。TLC: Rf = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 9. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OBzl (1.44 g, 2.42 mmol) をメタノール (12 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。5 時間後、Pd-C 触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OH · TFA を得た。

Boc-L-Ab7-OBzl (1.29 g, 3.12 mmol) を TFA (10 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ab7-OH · TFA を得た。これを DMF (16 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OH (1.21 g, 2.40 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.18 g, 3.12 mmol), HOBT · H₂O (368 mg, 2.40 mmol) 及びトリエチルアミン (1.34 ml, 9.6 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール/クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.20 g, 1.47 mmol, 収率 61%) を得た。TLC: Rf = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 10. H-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OH · TFA の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OBzl (1.20 g, 1.47 mmol) をメタノール (7.5 ml) に溶解し、Pd-C 触媒 (130 mg) 下、接触還元を行った。5 時間後、Pd-C 触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OH を得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応液を留去後、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、減圧下乾燥後に標記化合物 (70 mg, 1.02 mmol, 収率 69%) を得た。

実施例 11. Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) の合成

H-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OH · TFA (770 mg, 1.02 mmol), HATU (388 mg, 1.53 mmol) 及び DIEA (0.71 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (1000 ml)

に加えて、環化反応を行った。2時間後溶媒を留去して残渣を酢酸エチルに取り、10% クエン酸水溶液、4% NaHCO₃及び飽和食塩水で順次洗浄し、MgSO₄で乾燥した。酢酸エチルを留去して残った油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(4×30 cm, 2%メタノール/クロロホルム)で精製し、フォーム状物130 mg (21%)を得た。HPLC 保持時間、8.20 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 593 [M+H], (593.2).

実施例12. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (25 mg, 0.042 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (9.59 mg, 0.084 mmol) を加えて3時間反応させた。DMF を留去し、残渣を酢酸エチルに取り10% クエン酸水溶液、4% NaHCO₃及び飽和食塩水で順次洗浄した後、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して19 mg (76%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、8.20 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 589 [M+H], (589.3).

実施例13. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (SS-dimer : SCOP 296)の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (19 mg, 0.0322 mmol) を温めた DMF (2 ml) 溶液に溶かし、メタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶かし、1 M I₂ (エタノール) 0.04 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 7.4 mg (42%)。HPLC 保持時間、14.1 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1091.5648 [M+H], C₅₆H₈₃O₁₀N₈S₂ (1091.5674).

実施例14. Boc-L-Ile-DL-Pip-OBzlの合成

Boc-DL-Pip-OH (2.29 g, 10 mmol) とベンジルブロミド (1.79 ml, 15 mmol) とを DMF (20 ml) 中でトリエチルアミン (2.1 ml, 15 mmol) 存在下で反応させて、生じた Boc-DL-Pip-OBzl を油状物として得た。これを 2 N HCl / ジオキサ

ン(5 eq.) で3時間反応させて、H-DL-Pip-OBzl·HClを得た。

Boc-L-Ile-OH·1/2 H₂O (2.47 g, 10.7 mmol), H-D-Pro-OBzl·HCl (2.28 g, 8.9 mmol) 及びHOBt·H₂O (1.36 mg, 8.9 mmol) のDMF (20 ml) 溶液に氷冷下でDCC (2.20 g, 10.7 mmol) 及びトリエチルアミン (1.25 ml, 8.9 mmol) を加えた。8時間攪拌後、DMFを留去し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、油状の標記 diastereomer 混合物 (3.33 g, 7.70 mmol, 収率 87%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 15. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OBzl の合成

Boc-L-Ile-DL-Pip-OBzl (3.33 g, 7.70 mmol) をTFA (10 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応終了後TFAを留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ile-DL-Pip-OBzl·TFAを得た。これをDMF (16 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-OH (3.41 g, 11.6 mmol) を加え、続いて氷冷下HBTU (4.38 g, 11.6 mmol), HOBt·H₂O (1.18 g, 7.70 mmol) 及びトリエチルアミン(7.01 ml, 50.1 mmol)を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記 diastereomer 混合物 (3.46 g, 5.67 mmol, 収率 74%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 16. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Ab7-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OBzl (3.46 g, 7.37 mmol) をメタノール (30 ml) に溶解し、5% Pd-C (230 mg) 存在下接触還元を行った。8時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OHを得た。

Boc-L-Ab7-OBzl (3.05 g, 3.12 mmol) をTFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応終了後TFAを留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ab7-OBzl·TFAを得

- 30 -

た。これを DMF (16 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH (2.80 g, 5.39 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (2.66 g, 7.01mmol), HOBt · H₂O (825 mg, 5.39 mmol) 及びトリエチルアミン(3.02 ml, 21.6 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記 diastereomer 混合物 (4.07 g, 4.91 mmol, 収率 91%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 17. H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Ab7-OH · TFA の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-DL-Pip-OBzl (4.07 g, 4.91 mmol) をメタノール (10 ml) に溶解し、Pd-C 触媒 (300 mg) 存在下接触還元を行った。8 時間後、Pd-C 触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH を得た。これを TFA (10 mL) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応液を留去後、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、減圧下乾燥後に標記 diastereomer 混合物 (2.60 g, 3.51 mmol, 収率 72%) を得た。

実施例 18. Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) および Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

鎖状テトラペプチド、H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Ab7-OH (1.28 g, 2.0 mmol), HATU (1.14 g, 3.0 mmol) 及び DIEA (1.0 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (1000 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後、反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) を 372 mg (61%, HPLC 保持時間、8.94 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 607 [M+H], (607.2)), Cyclo(-L-Ab7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) を 238 mg (39%, HPLC 保持時間、10.5 min., FAB-MS (di

thiodiethanol), 607 [M+H], (607.2)), それぞれフォーム状として得た。

実施例 19. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (130 mg, 0.21 mmol) の DMF (1 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (69 mg, 0.315 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を留去し、反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄し、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して 109 mg (86%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、8.94 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 603 [M+H], (603.3).

実施例 20. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (SS-dimer : SCOP 298) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (114 mg, 0.198 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶解し、1 M I₂ (エタノール) 0.25 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 82 mg (78%)。HPLC 保持時間、11.6 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1063.5391 [M+H], C₅₄H₇₉O₁₀N₈S₂ (1063.5361).

実施例 21. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (240 mg, 0.40 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (69 mg, 0.60 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮し、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して 160 mg (66%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、10.5 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 603 [M+H], (603.3)

実施例 22. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (SS-dimer : SCOP 3

00)の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (160 mg, 0.27 mmol) の DMF (10 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶かし、1 M I_2 (エタノール) 0.31 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 54 mg (36%)。HPLC 保持時間、13.4 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1119.5939 [M+H], $C_{58}H_{87}O_{10}N_8S_2$ (1119.5986).

実施例 23. Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Pro-OH (17.2 g, 80 mmol) とベンジルプロミド (14.3 ml, 120 mmol) とを DMF (160 ml) 中氷冷下でトリエチルアミン (16.8 ml, 120 mmol) 存在下で反応させ、Boc-D-Pro-OBzl を油状物として得た。これを 2 N HCl / ジオキサン (5 eq.) で 3 時間反応させて、H-D-Pro-OBzl · HCl を得た。

Boc-L-Ile-OH · 1/2 H_2O (24.0 g, 100 mmol), H-D-Pro-OBzl · HCl (19.3 g, 80 mmol) 及び HOBt · H_2O (15.3 g, 100 mmol) の DMF (200 ml) 溶液に氷冷下で DCC (8.3 g, 30 mmol) 及びトリエチルアミン (3.5 ml, 25 mmol) を加えた。8 時間攪拌後、DMF を留去し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、油状の標記化合物 (21.5 g, 51 mmol, 収率 72%) を得た。TLC: Rf = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 24. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl (21.5 g, 51.4 mmol) を TFA (50 ml) に溶解し、氷冷下 1 時間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (100 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-OH (16.7 g, 56.5 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (29.4 g, 77 mmol), HOBt · H_2O (7.8

- 33 -

7 g, 51 mmol) 及びトリエチルアミン (25.2 ml, 180 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (22.0 g, 37 mmol, 収率 72%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 25. Boc-L-Ab6-OTmse の合成

Boc-L-Ab6-OH (620 mg, 2.0 mmol) とトリメチルシリルエタノール (0.572 ml, 4.0 mmol) とを DCM (6 ml) 中で 4-ジメチルアミノピリジン (24.4 mg, 0.2 mmol) 存在下 6 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 10% 酢酸エチル / ヘキサン) で精製し、油状の標記化合物 (820 mg, 1.62 mmol, 収率 81%) を得た。TLC: R_f = 0.97 (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 26. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OTmse の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.01 g, 1.70 mmol) をメタノール (20 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。8 時間後、Pd-C 触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH を得た。

Boc-L-Ab6-OTmse (1.51 g, 3.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後反応液を留去し、減圧下乾燥し、H-L-Am6-OTmse · TFA を得た。これを DMF (3.5 ml) に溶解させ、氷冷下で 4 分割した Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH (819 mg, 1.62 mmol), HATU (776 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン (0.24 ml, 1.7 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム)

- 34 -

で精製し、標記化合物 (888 mg, 1.09 mmol, 収率 64%) を得た。TLC: Rf = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

実施例 27. Boc-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.19 g, 2.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (4.0 ml) に溶解させ、Boc-L-Ab7-OH (652 mg, 2.0 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.14 g, 3.0 mmol), HOBt · H₂O (306 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン (1.4 ml, 10 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.51 g, 1.89 mmol, 収率 94%) を得た。HPLC 保持時間、9.15 min.

実施例 28. Boc-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.19 g, 2.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (4.0 ml) に溶解させ、Boc-L-Ab8-OH (676 mg, 2.0 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.14 g, 3.0 mmol), HOBt · H₂O (306 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン (1.4 ml, 10 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.44 g, 1.76 mmol, 収率 88%) を得た。HPLC 保持時間、10.9 min.

実施例 29. Boc-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.19 g, 2.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解

- 35 -

し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (4.0 ml) に溶解させ、Boc-L-Ab9-OH (775 mg, 2.2 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.14 g, 3.0 mmol), HOBt · H₂O (306 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン(1.4 ml, 10 mmol) を加え、3 時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.31 g, 1.58 mmol, 収率 79%) を得た。HPLC 保持時間、11.7min.

実施例 30. H-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH · TFA の合成

Boc-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OTmse (888 mg, 1.11 mmol) をエタノール (10 ml) に溶解し、氷冷下で 3 分割した 1 N NaOH 水溶液 (1.32 ml, 1.33 mmol) を加え、3 時間放置した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮し、Boc-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH を得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応液を留去後、減圧下乾燥し、油状の標記化合物 (778 mg, 1.07 mmol, 収率 96%) を得た。

実施例 31. H-L-Ab7-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA の合成

Boc-L-Ab7-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.51 g, 1.89 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。5 時間後、Pd-C 触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-L-Ab7-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-OH を得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応液を留去後、減圧下乾燥し、油状の標記化合物 (1.15 mg, 1.84 mmol, 収率 97%) を得た。

実施例 32. H-L-Ab8-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA の合成

Boc-L-Ab8-D-Tyr (Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.44 g, 1.76 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。5 時間後、Pd-C

- 36 -

触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OHを得た。これをTFA(5 ml)に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、減圧下乾燥し、油状の標記化合物(1.15 mg, 1.84 mmol, 収率97%)を得た。

実施例33. H-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH・TFAの合成

Boc-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl(1.31 g, 1.58 mmol)をメタノール(2 ml)に溶解し、5% Pd-C(150 mg)存在下接触還元を行った。12時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OHを得た。これをTFA(5 ml)に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、エーテル/石油エーテル(1:10)を加えて固化し、減圧下乾燥後に標記化合物(905 mg, 1.42 mmol, 収率90%)を得た。

実施例34. Cyclo(-L-Ab6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成

H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH・TFA(778 mg, 1.07 mmol), HATU(616 mg, 1.62 mmol)及びDIEA(0.75 ml)を5分割して30分毎にDMF(110 ml)に加えて、環化反応を行った。2時間後溶媒を留去して残渣を酢酸エチルに取り、10%クエン酸、4%NaHCO₃、および食塩水で洗い、MgSO₄で乾燥した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(4×30 cm, 1%メタノール/クロロホルム)で精製し、無色油状物146 mg(23%)を得た。HPLC保持時間、9.06 min., HRMS(FAB, dithiodiethanol), 579.2197 [M+H], C₂₇H₄₁O₅N₄⁷⁹Br(579.2182)。

また、この時Ab6の側鎖末端Brに置換して転移したHOAt adductを含む環状テトラペプチド、cyclo(-L-A(OAt)6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)167 mg(27%)をフォームとして得た。HPLC保持時間、8.16 min., HRMS(FAB, dithiodiethanol), 635.3312 [M+H], C₃₂H₄₃O₆N₆(635.3306)。

実施例35. Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成

H-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH・TFA(1.15 g, 1.84 mmol), HATU(1.05

g, 2.76 mmol) 及び DIEA (1.28 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (180 ml) に加えて、環化反応を行った。上と同様に精製して 700 mg (64%) のフォームを得た。HPLC 保持時間、9.90 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 593.2300 [M+H], $C_{28}H_{42}O_5N_4^{79}Br$ (593.2339).

実施例 36. Cyclo(-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

H-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA (512 mg, 0.80 mmol), HATU (455 mg, 1.20 mmol) 及び DIEA (0.56 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (80 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後、反応液を濃縮し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、267 mg (55%) のフォームを得た。HPLC 保持時間、9.95 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 607.2501 [M+H], $C_{29}H_{44}O_5N_4^{79}Br$ (607.2495).

実施例 37. Cyclo(-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

H-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA (905 mg, 1.41 mmol), HATU (833 mg, 2.12 mmol) 及び DIEA (0.64 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (150 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後、反応液を濃縮し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、533 mg (61%) のフォームを得た。HPLC 保持時間、10.9 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 621.2625 [M+H], $C_{30}H_{46}O_5N_4^{79}Br$ (621.2652).

実施例 38. Cyclo(-L-Am6(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (146 mg, 0.252 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (57.6 mg, 0.504 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水

で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して 114 mg (79%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、9.06 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 575.2879 [M+H], C₂₉H₄₃O₆N₄S (575.2903).

実施例 39. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (133 mg, 0.226 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液に チオ酢酸カリウム (52 mg, 0.452 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、生成したチオエステルを単離精製して 118 mg (89%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、9.90 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 589.3605 [M+H], C₃₀H₄₅O₆N₄S (589.3060).

実施例 40. Cyclo(-L-Am8(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (267 mg, 0.439 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に チオ酢酸カリウム (100 mg, 0.878 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、生成したチオエステルを単離精製して 222 mg (84%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、9.95 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 603.3244 [M+H], C₃₁H₄₇O₆N₄S (603.3216).

実施例 41. Cyclo(-L-Am9(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (250 mg, 0.402 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (91.4 mg, 0.804 mmol)を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、生成したチオエステルを単離精製して 190 mg (77%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、10.9 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 617.3364 [M+H], C₃₂H₄₉O₆N₄S (617.3373).

実施例 42. Cyclo(-L-Am6(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 302) の合成

- 39 -

cyclo(-L-Am6(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (114 mg, 0.198 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶かし、1 M I_2 (エタノール) 0.2 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 82 mg (78%)。HPLC 保持時間、11.6 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1063.5391 [M+H], $C_{54}H_{79}O_{10}N_8S_2$ (1063.5361).

実施例 4 3. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 304) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (118 mg, 0.201 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニアを作用させてアセチル基を除去し、1 M I_2 (エタノール) を加えて末端スルフィドリル基を酸化し、精製して SS dimer を白色粉末として得た。収量 98 mg (89%)。HPLC 保持時間、12.3 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1091.5684 [M+H], $C_{56}H_{83}O_{10}N_8S_2$ (1091.5674).

実施例 4 4. Cyclo(-L-Am8(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 306) の合成

cyclo(-L-Am8(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (222 mg, 0.368 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニアを作用させてアセチル基を除去し、1 M I_2 (エタノール) を加えて末端スルフィドリル基を酸化し、精製して SS dimer を白色粉末として得た。収量 167 mg (81%)。HPLC 保持時間、13.0 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1119.5961 [M+H], $C_{58}H_{86}O_{10}N_8S_2$ (1119.5987).

実施例 4 5. Cyclo(-L-Am9(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 308) の合成

cyclo(-L-Am9(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (95 mg, 0.154 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニアを作用させてアセチル基を除去し、1 M I_2 (エタノール) を加えて末端スルフィドリル基を酸化し、精製して SS

- 40 -

dimer を白色粉末として得た。収量 84 mg (98%)。HPLC 保持時間、14.2 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1147.6307 [M+H], $C_{60}H_{91}O_{10}N_8S_2$ (1147.6300).

実施例 46. Cyclo(-L-Am7(SMEt)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SC OP 404) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (270 mg, 0.45 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去し、アンモニアを留去後、2-メルカプトエタノール (10 eq.) を加え、1 M I_2 (エタノール) 0.2 ml を加えて酸化を行った。生成した SS hybrid を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製し、凍結乾燥を行い、標記化合物を白色粉末として得た。収量 30 mg (11%)。HPLC 保持時間、8.9 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 622.2877 [M], $C_{30}H_{46}O_6N_4S_2$ (622.2859).

実施例 47. Cyclo(-L-Am7(S2Py)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SC OP 401) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (40 mg, 0.07 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に 2,2'-ジチオピリジン (31 mg, 0.14 mmol) 及びメタノール性アンモニア (10 eq.) を加え、8 時間攪拌した。反応液を濃縮後、粉状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、標記化合物を得た。収量 15 mg (38%)。HPLC 保持時間、9.6 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 656.2952 [M+H], $C_{33}H_{45}O_5N_5S_2$ (656.2940).

実施例 48. Cyclo(-L-Am7(S4Py)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SC OP 402) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (100 mg, 0.17 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に 4,4'-ジチオピリジン (75 mg, 0.34 mmol) 及びメタノール性アンモニア (20 eq.) を加え、8 時間攪拌した。反応液を濃縮後、粉状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、標記化合物を得た。収量 13 mg (13%)。HPLC 保持時間、6.5 min., H

RMS (FAB, dithiodiethanol), 656.2934 [M+H], $C_{33}H_{46}O_5N_5S_2$ (656.2940).

実施例 49. Cyclo(-L-Am7(SE11)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SCOP 403) の合成

5,5'-ジチオビス(2-ニトロベゼン酸) (515 mg, 1.4 mmol) の DMF (2.8 mL) 溶液に、氷冷下ジメチルアミン (343 mg, 3.0 mmol), DCC (867 mg, 3.0 mmol) 及び HOBt · H₂O (214 mg, 1.4 mmol) を加え、8 時間攪拌した。反応終了後反応液を濃縮し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。無水 MgSO₄ で乾燥した後、酢酸エチルを留去した。真空乾燥後、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1% メタノール / クロロホルム) で精製し、5,5'-ジチオビス(2-ニトロベゼン酸ジメチルアミド) を得た。

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (130 mg, 0.22 mmol) の DMF (2 ml) 溶液に 5,5'-ジチオビス(2-ニトロベゼン酸ジメチルアミド) (198 mg, 0.44 mmol) 及びメタノール性アンモニア (10 eq.) を加え、6 時間攪拌した。反応液を濃縮後、少量の DMF に溶かし、HPLC (column : YMC-Pack ODS-A 10×250 mm) で精製し、標記化合物を得た。収量 13 mg (9.3%)。HPLC 保持時間、9.5 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 771.3201 [M+H], $C_{37}H_{50}O_8N_6S_2$ (771.3210).

実施例 50. Cyclo(-L-Am7(SMe)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SCOP405) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (118 mg, 0.2 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に 4-methoxybenzylmercaptan (0.056 ml, 0.4 mmol) およびトリエチルアミン (0.07 ml, 0.5 mmol) を加えて、室温で 2 時間反応させた。生成した cyclo(-L-Am7(Mb)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) を酢酸エチルで抽出し、精製した後メタノール (18 ml) 中で Dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate (0.9 mmol, 176 mg) と、室温で 2 時間反応させた。反応液を濃縮し、クロロホルムに溶解し、シリカゲルクロマトグラフィー (2×25 cm, 2% メタノール/クロロホルム) で精製し、目的物を得た。収量 69 mg (65%)。TLC Rf: 0.90 (CHCl₃,

- 4 2 -

/ MeOH = 19 / 1)。HPLC 保持時間、12.28 min. HR-FAB+ MS: 593.2777 (calcd. : 592.2753, composition: $C_{29}H_{44}O_5N_4S_2$, matrix: 2,2'-dithiodiethanol)。

実施例 5 1. HDAC 酵素阻害活性の測定

本実施例では SCOP の HDAC 酵素阻害活性の測定を行った。活性を測定した Sulfur-containing cyclic peptides (SCOP) の構造の一覧を図 1 ~ 4 に示す。天然の HDAC 阻害剤である図 5 に示すような Cyl-1, Cyl-2 (Furumai et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 87-92.) を元に環状テトラペプチド構造のコンフォメーション及び活性基までの炭素鎖数を検討した。

天然の Cyl-1, Cyl-2 は立体コンフォメーションが LDL 体であるが、LDL のコンフォメーションを持つものについても検討した。なお、以下に示す実験結果において、X = H ではジスルフィド結合を切断するため、DTT を共存させている。

HDAC 阻害活性測定を行うにあたり、次の通り HDAC 溶液を調製した。100 mm ディッシュに 1×10^7 個の 293T 細胞をまき、24 時間後にヒト HDAC 1、4 またはマウス HDAC 6 を発現するベクター ($1 \mu\text{g}$) を LipofectAmine 2000 reagent (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) を用いてトランスフェクションした。なお、上記ヒト HDAC1 発現ベクターは p cDNA 3-HD 1 (Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E. (1997) J. Biol. Chem. 272, 28001-28007.)、ヒト HDAC 4 発現ベクターは p cDNA 3.1 (+)-HD 4 (Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W. & Verdin, E. (1999) J. Biol. Chem. 274, 11713-11720.)、マウス HDAC 6 発現ベクターは p cDNA-mHDA 2/HDAC 6 (Verdel, A. & Khochbin, S. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2440-2445.) を用いた。OPTI-MEM 中で 5 時間ベクターを取り込ませた後、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に培地を交換して 19 時間インキュベートした。細胞を PBS で洗った後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (p

- 43 -

H7.5), 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) に懸濁し、ソニケーションした。上清を遠心分離により集め、ProteinA/G plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) を用いて、非特異的タンパクを除いた。その後、HDAC1、HDAC4を発現させた細胞上清には、anti-FLAG M2抗体 (Sigma-Aldrich Inc.) を加え、HDAC6を発現させた細胞上清にはanti-HA抗体 (clone 3F10, Roche Molecular Biochemicals) を加えて4°Cで1時間反応させた。これにアガロースビーズを加えて4°Cで1時間反応させた後、lysis bufferでアガロースビーズを3回洗い、HD buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10%グリセロール, a complete protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Germany)) で一回洗った。HD buffer (200 μ l) 中FLAGペプチド (40 μ g) (Sigma-Aldrich Inc.) またはHAペプチド (100 μ g) で4°C、1時間インキュベートしてアガロースビーズから結合したタンパクを回収し、HDAC反応溶液とし、以下のHDAC阻害活性測定に用いた。

インビトロのHDAC阻害活性を以下のように評価した。被験化合物をDMSOに溶解して濃度10 mMとして、これを阻害剤の原溶液とした。陽性コントロールとしてHDAC酵素阻害剤として知られているトリコスタチンA (TSA) をDMSOに溶解して、濃度10 mMの原溶液を調製した。測定は被験化合物またはコントロールのTSA存在下、上記HDAC溶液と [3 H] で標識したアセチル化ヒストン基質溶液を37°Cで15分間インキュベートすることで行った (反応容積100 μ l)。反応を10 μ lのHClを添加して止め、酵素反応で切り出された [3 H] 酢酸を酢酸エチルで抽出して放射活性を測定した。なお、陰性コントロールとして、阻害剤を反応系に添加せず、同じ操作を行った。阻害活性は、陰性コントロールにおけるHDAC活性の50%阻害濃度 (「IC50 (nM)」) で表した (表1~4)。

また、*in vivo* のHDAC阻害活性はp21プロモーター誘導活性を指標に次の通

- 4 4 -

り測定した。実験に用いた MFL-9 細胞はヒト野生型 p21 プロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子 (Dr. B. Vogelstein) を安定に保持した細胞であり、10%FBS を添加したフェノールレッド不含 DMEM 培地を用い、37°C、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。この MFL-9 細胞を 85000 個/well の細胞密度で 96 穴マイクロプレートに播種し、各 well 当たり上記の培地 99 μ l 中で、6 時間培養した後、被験化合物溶液 1 μ l を添加し、引き続き 18 時間培養した。また、ここでも TSA を HDAC 阻害活性に起因する p21 プロモーター誘導活性の陽性コントロール化合物とした。

Luc Lite (Packard BioScience Company) を用い、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素反応の生成物に起因する発光強度を測定した。なお、被験化合物の添加量を零とした群を陰性コントロール群とし、この群における測定値を基準値とした。各被験化合物の添加濃度における活性は、前記の基準値を 1 とする相対値で表した。被験化合物の活性強度は TSA による最大活性値の 50%の値を示す時の濃度(「EC50 (nM)」)を用いて比較した(表 1~4)。

表 1

X = H である。(DTT 共存)

阻害剤 SCOP No.	IC50 (nM)			P21 プロモーター		炭素鎖 数
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)	構造	
148	81.4	17.0	> 500000	6720	Cyl1(LDLL)	C5
149	2.37	5.22	44300	596	Cyl2(LDLL)	C5
150	2.10	4.26	5560	504	Cyl2(LDLD)	C5
151	932	7340	28500	> 100000	Cyl1(LDLD)	C4
152	4.60	2.06	1400	309	Cyl1(LDLD)	C5
153	9.13	91.0	8050	9850	Cyl1(LDLD)	C6
154	38.1	99.2	2470	31400	Cyl1(LDLD)	C7

表1のインビトロの阻害活性、インビボのP21プロモータ活性で示される通り、天然型コンフォメーションであるLDLL体よりもLDLD体の方がより活性が高く、活性基であるチオール基までの炭素鎖数はC5のものが最適であることがわかった。

表2

X = 左の構造を持つ化合物 (ホモダイマー)

阻害剤 SCOP No.	IC50 (nM)			P21 プロモーター		
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)	構造	炭素鎖数
296	763	222	> 500000	7730	Cyl1(LDLL)	C5
298	114	33.7	418000	5800	Cyl2(LDLL)	C5
300	61.1	36.2	255000	7370	Cyl2(LDLD)	C5
302	7200	> 500000	> 500000	> 100000	Cyl1(LDLD)	C4
304	142	145	> 500000	341	Cyl1(LDLD)	C5
306	153	319	1320000	847100000	Cyl1(LDLD)	C6
308	983	505	745000	235000	Cyl1(LDLD)	C7

X = H の時と同様、ホモダイマーにおいても天然型コンフォメーションである LDLL 体よりも LDLD 体の方が高活性で、活性基であるチオール基までの炭素鎖数は C5 のものが最適であることが示された。

表 3

X = 低分子化合物 (ハイブリッド)

阻害剤	IC50 (nM)			P21 プロモーター	
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)	構造
SCOP No.					
401	NT	NT	NT	1360	152 + 2-Pyridine
402	6.76	68.3	1610	1310	152 + 4-Pyridine
403	21.5	18.9	6080	1800	152 + Elman's reagent
404	217	355	201000	1360	152 + mercaptoethanol
405	119	405	191	3260	152 + methylmercaptane
401/DTT	NT	NT	NT	815	
402/DTT	0.553	1.12	2010	470	
403/DTT	1.15	1.53	4730	748	
404/DTT	2.44	13.0	15400	754	

(NTは、テストしていないことを示す)

SCOP 152 と低分子化合物との hybrid 体でも阻害活性を有することが示された。

表 4

陽性コントロール (TSA)

阻害剤	IC50 (nM)			P21 プロモーター
TSA	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)
TSA	19.2	68.3	27.2	445

以上の結果より、天然型コンフォメーションである LDLL 体よりも LDLD 体の方が高活性である。更に、活性基であるチオール基までの炭素鎖数は C5 のものが

- 48 -

最適であることがわかった。また、HDAC6 に対する阻害活性がかなり低いことから、酵素サブタイプ選択的な阻害活性を持つことが示された。また、今回の化合物は酵素レベルでは DTT 共存下チオール体 (X = H) の時に高い HDAC 阻害活性性能を持つ。これに対し、細胞レベルでは X = 左の構造を持つ化合物、X = 低分子化合物の時でも高活性を示している。細胞内に取り込まれたジスルフィド体が細胞内の還元力により還元されチオール基が露出して活性化したと考えられる。

次に、DTT が何らかの作用を及ぼす可能性があることから、精製した SCOP152 を使用し、DTT 非共存下で実験を行った。

表 5

阻害剤	IC50 (nM)			P21 プロモーター
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)
152	NT	NT	NT	3510

(NTは、テストしていないことを示す)

DTT 共存下に比べて、EC50 値が大きくなった。DTT が共存すると培地の pH が下がり、モノマーの安定性が変わるのではないかと考えられる。もしくは、DTT が何らかの保護基として作用した可能性がある。以降の実験は精製した SCOP152 を使用し、DTT 非共存下で実験を行った。

実施例 5 2. 細胞レベルでの HDAC 阻害活性の測定

ヒストンアセチル化レベルの測定は、HeLa 細胞に対して被験化合物を作用させ、抗アセチル化リジン抗体を使用してヒストンのアセチル化レベルをウェスタンで確認することにより行った。詳細には、ヒト子宮がん細胞 (HeLa) は 10% FBS を添加した DMEM 培地を用い、37°C、5% 二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。この細胞を 15000 個/ml の細胞密度で 6 穴プレートに 2 ml 播種し、18 時間培養した後、被験化合物溶液を添加し、引

- 49 -

引き続き6時間培養した。細胞をPBSで洗った後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% Nonidet P-40) に懸濁し、ソニケーションした。上清を遠心分離により集め、SDS buffer と混合し、100°Cで5分間処理したサンプルを15% SDS ゲルで電気泳動後、メンブレンフィルムに転写した。1次抗体として AKL5C1 (ジャパンエナジー)、2次抗体: anti-マウス (LIFE SCIENCE) で処理後 ECL (Amersham Pharmacia Biotech) 処理し、アセチル化バンドの検出を行った (図6)。なお、図6において記載している化合物の濃度の単位は nM である。

図6に示す通り、p21 プロモーター誘導活性測定の結果 (EC50) と一致した阻害傾向が示された。活性基であるチオール基までの炭素鎖数は C5 のものが最適である。

実施例 53. 細胞毒性テスト

SCPO の細胞毒性テストをヒト肺正常細胞 (TIG-3)、ヒト子宮がん細胞 (HeLa) を用いて行った。これら TIG-3 細胞、HeLa 細胞を 10% FBS を添加した DMEM 培地を用い、37°C、5% 二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。TIG-3 は 30000 個/well、HeLa は 10000 個/well の細胞密度で 96 穴マイクロプレートに播種し、各 well 当たり上記の培地 100 μ l 中で 18 時間培養した後、培地に希釈した被験化合物溶液を添加し、引き続き 48 時間培養した。

各 well の上清 30 μ l を別の 96 穴マイクロプレートに移し (A)、残った上清を除いた。そこに、0.5% Triton-X / PBS を 100 μ l 加えて、細胞を溶解させ、さらに別の 96 穴マイクロプレートに 30 μ l ずつ移した (B)。これらの 96 穴マイクロプレート A、B の各 well に LDH-Cytotoxic Test (Wako) の基質溶液を 30 μ l ずつ入れ、呈色反応をさせた。十分な呈色反応が進んだら、反応停止液 60 μ l を加えて呈色反応を停止させた。OD560 nm の発色強度をマイクロプレートリーダー (Softmax) で測定した。遊離 LDH 率として $[A/(A+B)]$ を求めた。阻害活性は、遊離

LDH 率 50 % となる時の濃度を LD50 として示した。なお、がん細胞選択的細胞傷害活性の値 (正常細胞 LD50 / がん細胞 LD50) が高いほど、がん細胞選択的に細胞死を誘導していることを示す。

表 6

阻害剤	LD50 (nM)		がん細胞選択的 細胞傷害活性
	HeLa	TIG-3	
TSA	41.4	1580	38.2
SCOP 152	370	6780	18.3
SCOP 304	151	3471	23.0
SCOP 402	1170	13300	11.4
SCOP 405	179	7900	44.1
SCOP 304/DTT	47.1	1190	25.2
SCOP 402/DTT	161	4460	27.8

上記表 6 に示されている通り、今回の化合物は TSA とほぼ同程度のがん細胞選択的に強い細胞傷害活性を有することが示された。

実施例 5 4. 安定性の評価

SCOP 152、SCOP 304 及び SCOP 402 の血清中での安定性の評価は以下の方法で行った。FCS 99 μ l 中に SCOP 152 及び SCOP 304 (10 mM)、SCOP 402 (10 mM) を 1 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。これを時間ごとに 1 ml の酢酸エチルと飽和のために十分な量の NaCl を加えて抽出した。この酢酸エチル相 800 μ l をとり、酢酸エチルを留去した後 DMSO 100 μ l を加えて溶解させた。この溶液を更に DMSO で 10 倍希釈したものをを用いて p21 プロモータ誘導活性の測定を行った。インキュベート時間 0 の活性を 100% として活性を比較した (図 7)。

図 7 に示す通り、血清中で SCOP 304 および SCOP 402 は SCOP 152 よりも長時間安定に活性を保持できることが示された。これはチオール基が保護されたことにより安定性が上昇したと考えられる。

次に、細胞レベルでの安定性の検討を行った。ヒストンのアセチル化レベルに

より検討した。HeLa 細胞に対して化合物を作用させ、抗アセチル化リジン抗体を使用してヒストンのアセチル化レベルをウェスタンで確認した (図 8)。詳細には、ヒト子宮がん細胞 (HeLa) は 10%FBS を添加した DMEM 培地を用い、37°C、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。この細胞を 15000 個/ml の細胞密度で 6 穴プレートに 2 ml 播種し、18 時間培養した後、被験化合物溶液を TSA、SCOP152 および SCOP304 は 200 nM、SCOP402 は 1 μ M になるよう添加し、引き続き適宜時間培養した。細胞を PBS で洗った後、1 ysis buffer (50mM Tris-HCl (pH7. 5)、120mM NaCl、5mM EDTA、0. 5% Nonidet P-40) に懸濁し、ソニケーションした。上清を遠心分離により集め、SDS buffer と混合し、100°Cで 5 分間処理したサンプルを 15%SDS ゲルで電気泳動後、メンブレンフィルムにトランスファーした。1 次抗体として AKL5C1 (ジャパンエナジー)、2 次抗体 : anti-マウス (LIFE SCIENCE) で処理後 ECL (amersham pharmacia biotech) 処理し、アセチル化バンドの検出を行った。

本発明の化合物は HDAC1, 4 に対しては強い阻害活性を示したが、HDAC6 に対してはほとんど阻害活性を持たなかった。HDAC6 は精巣などで発現が高く、正常な組織の分化に関わると推定されるが、発がんとの関わりは示されておらず、HDAC6 を阻害することは副作用につながる可能性が考えられる。本発明の化合物には HDAC6 阻害作用が非常に弱く、TSA がないサブタイプ選択性があることから新しい阻害剤として有用である。更に今回の化合物はテトラペプチド骨格の構造を容易に変えることができるため、さらなる選択性を持たせることができると期待される。

産業上の利用の可能性

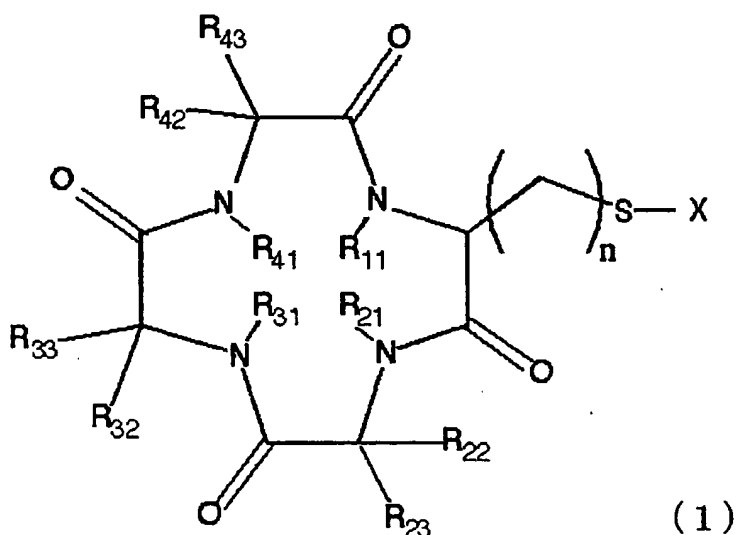
上述の通り、本発明の化合物は、HDAC 1, 4 に対して選択的に強い阻害活性を示す。従って、本発明の化合物は、HDAC、とりわけ、HDAC 1, 4 に関与している疾患の治療または予防のための薬剤として、利用し得る。また、本発明の化合物

- 52 -

の製造方法は、原料として2-アミノ-n-ハロアルカン酸を用いることにより、種々のタイプの化合物を簡便に合成することができる。そのため、本発明の製造方法を用いることにより、より選択性の高いHDAC阻害剤などの開発に寄与することが期待される。

請求の範囲

1. 以下の一般式(1)で示される化合物。

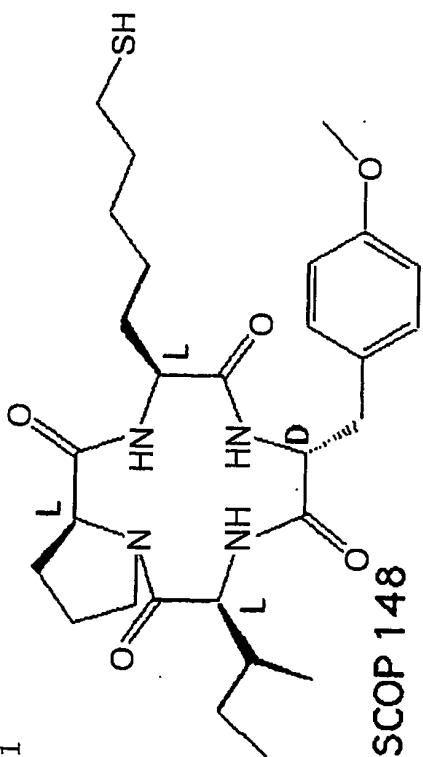


[式中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} はそれぞれ独立して水素、炭素数1~6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数1~6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基、炭素数1~6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数1~6の環構造を備えた鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を示す。Xは、水素、当該Xよりも左に示す構造体と同一構造、硫黄原子を含む任意の構造体であって当該硫黄原子と上記式1中の硫黄原子とがジスルフィド結合を介して結合し得る置換基を有することもあるアルキル基もしくはアリール基、または前記 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , または R_{43} の末端に結合し該Xの左に位置する硫黄原子と分子内ジスルフィ

- 57 -

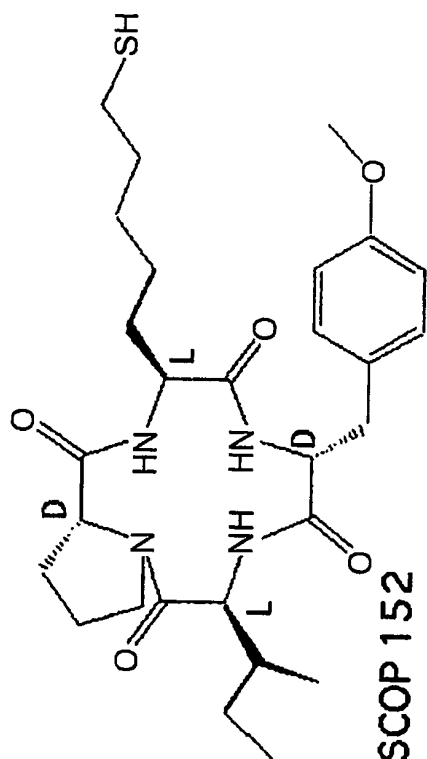
得、次いで一般式(9)で示される化合物をアンモニアまたは他のアミン類及び酸化剤で処理することを含む、請求項1記載の化合物の製造方法。

图 1



Cyl-1 type, LDLL, C5

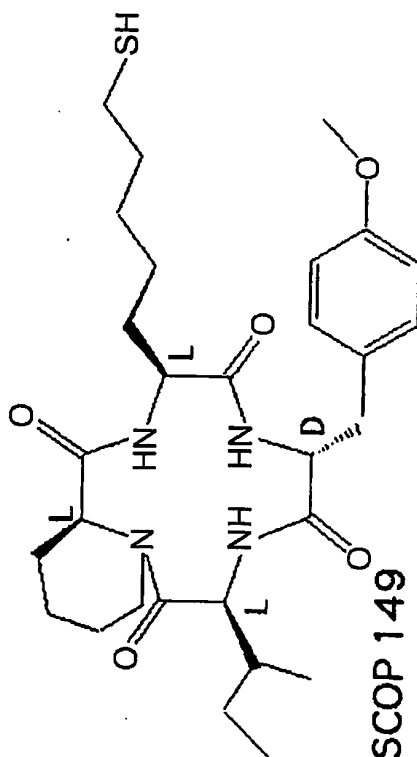
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-LPro-)



Cyl-1 type, LDLD, C5

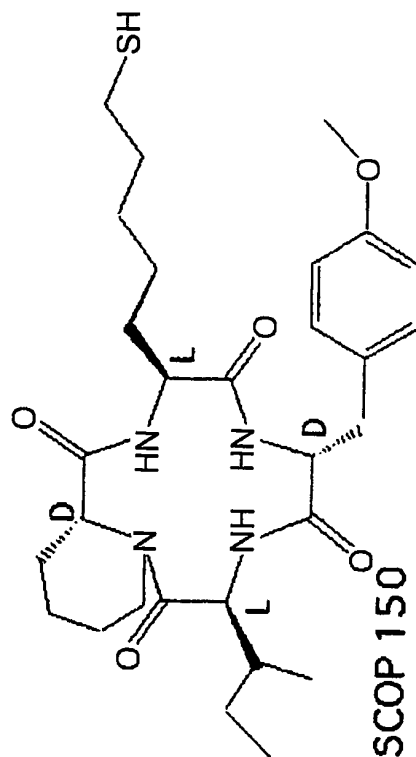
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

1 / 8



Cyl-2 type, LDLL, C5

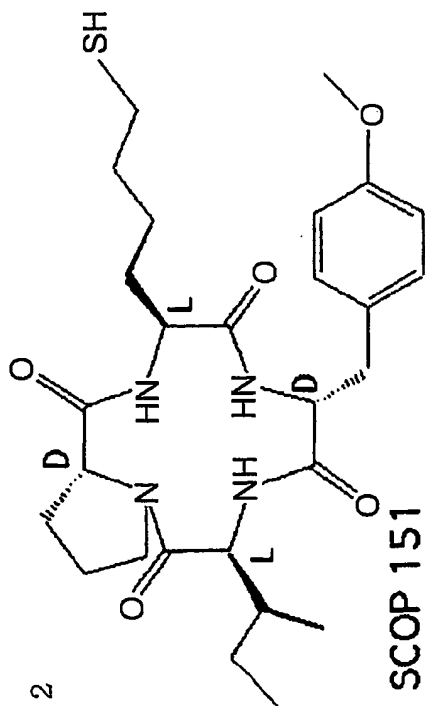
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-LPip-)



Cyl-2 type, LDLD, C5

cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-DPip-)

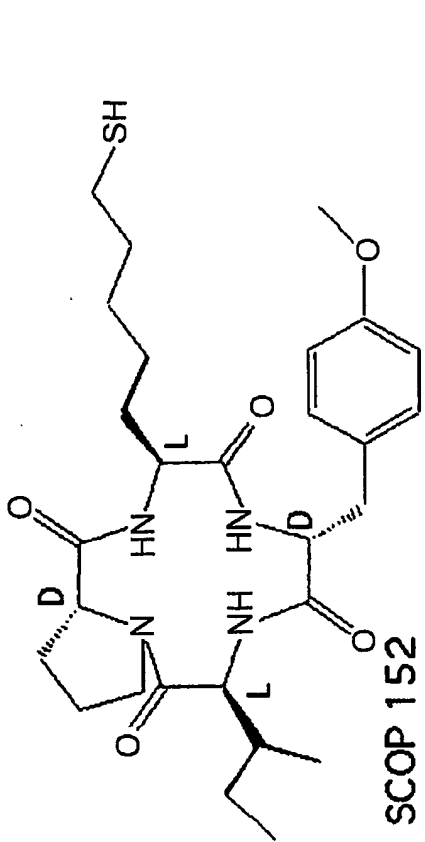
図 2



SCOP 151

Cyl-1 type, LDLD, C4

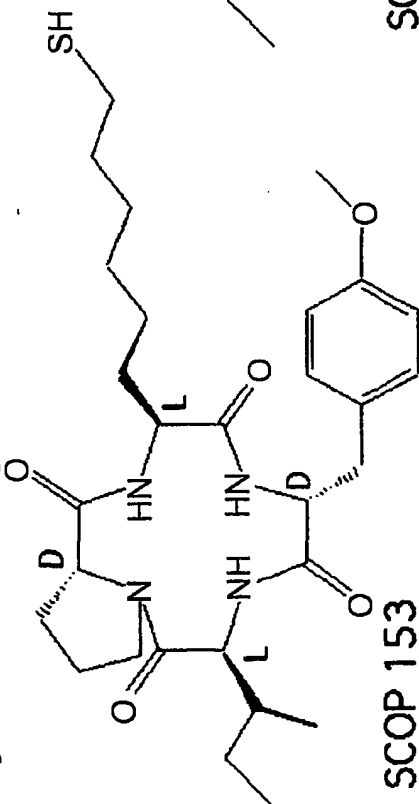
cyclo(-LAm6-DTyr(Me)-Llle-DPro-)



SCOP 152

Cyl-1 type, LDLD, C5

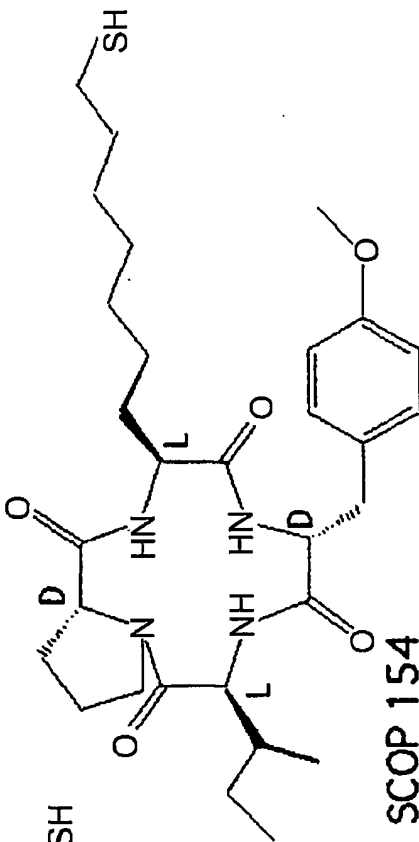
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-DPro-)



SCOP 153

Cyl-1 type, LDLD, C6

cyclo(-LAm8-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

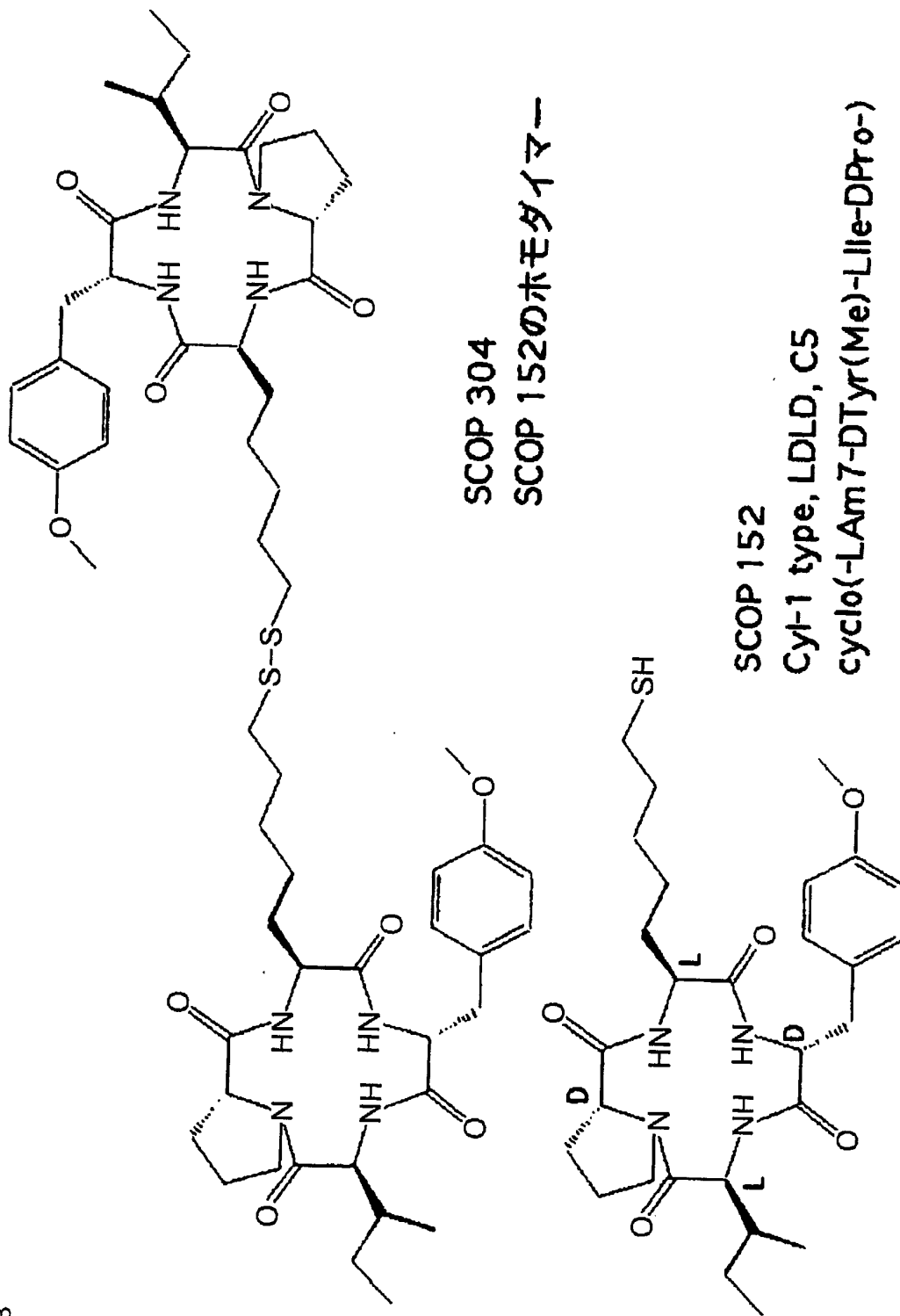


SCOP 154

Cyl-1 type, LDLD, C7

cyclo(-LAm9-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

図 3



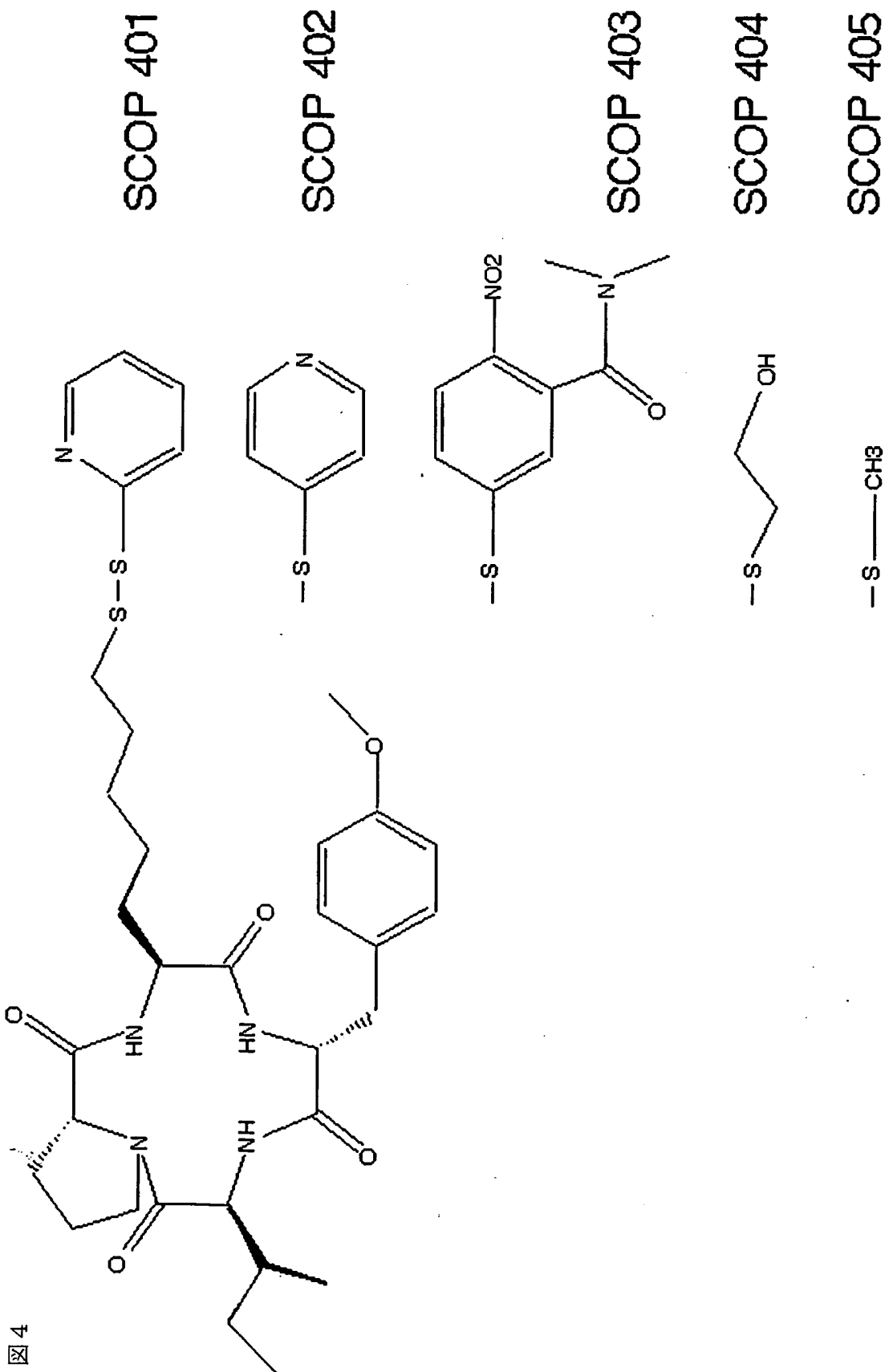


図 6

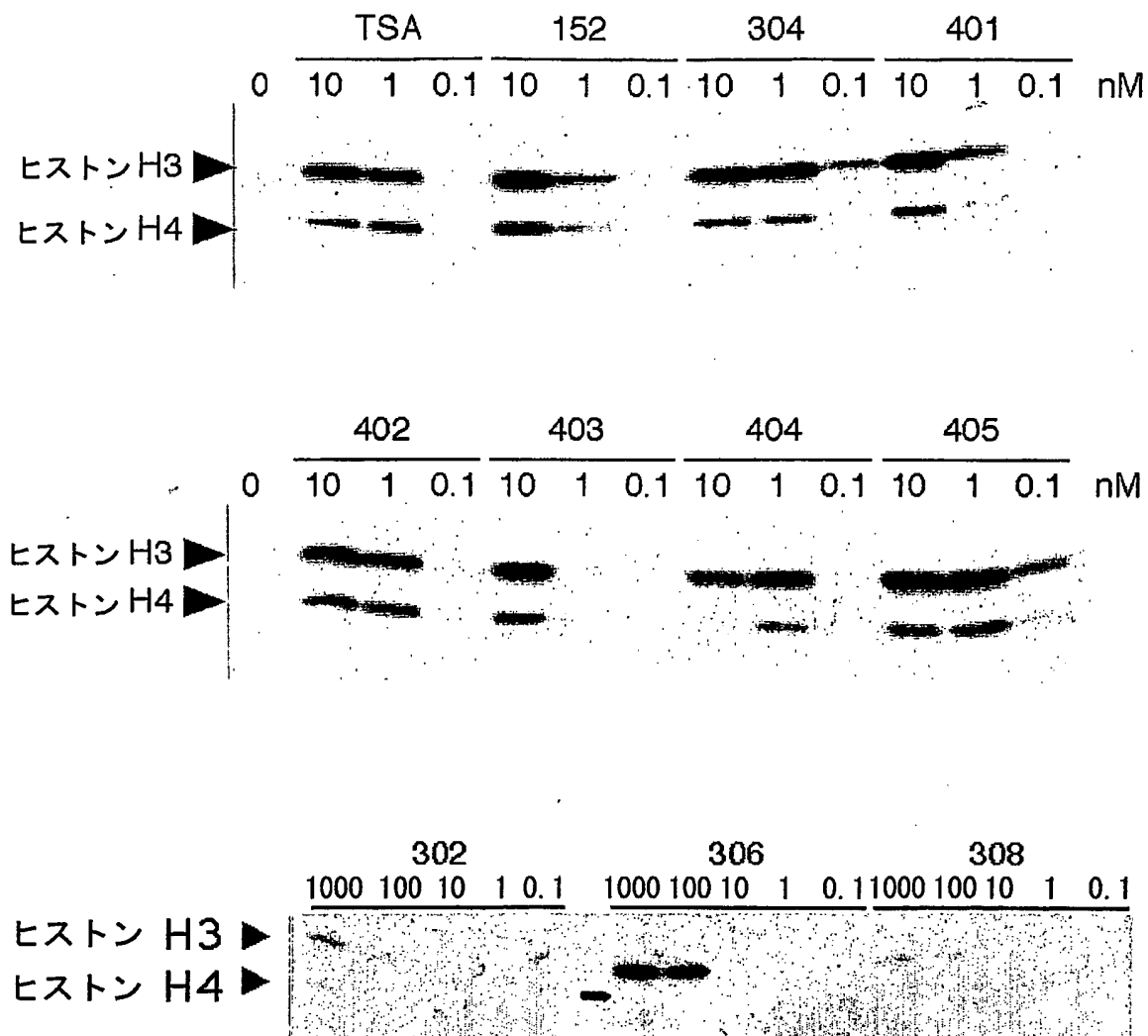


図 7

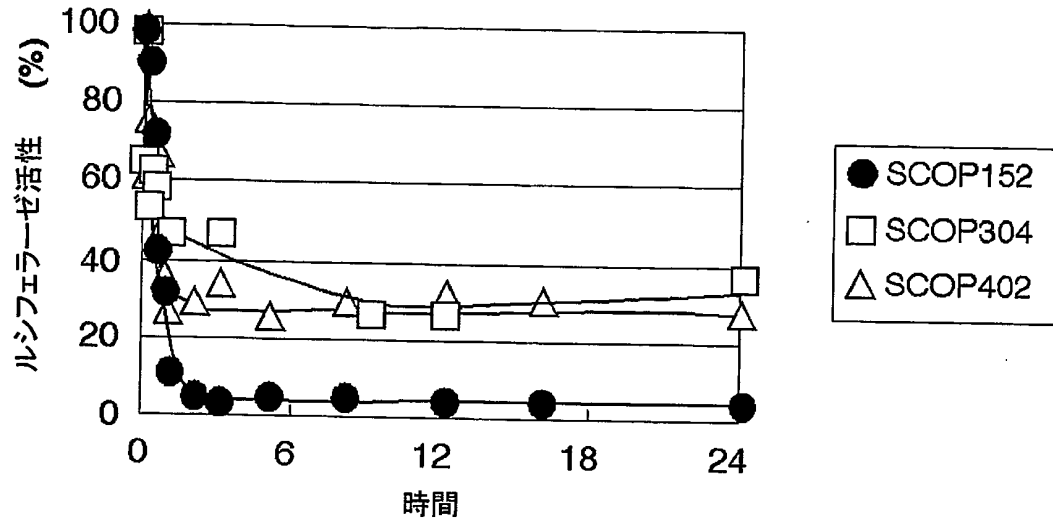
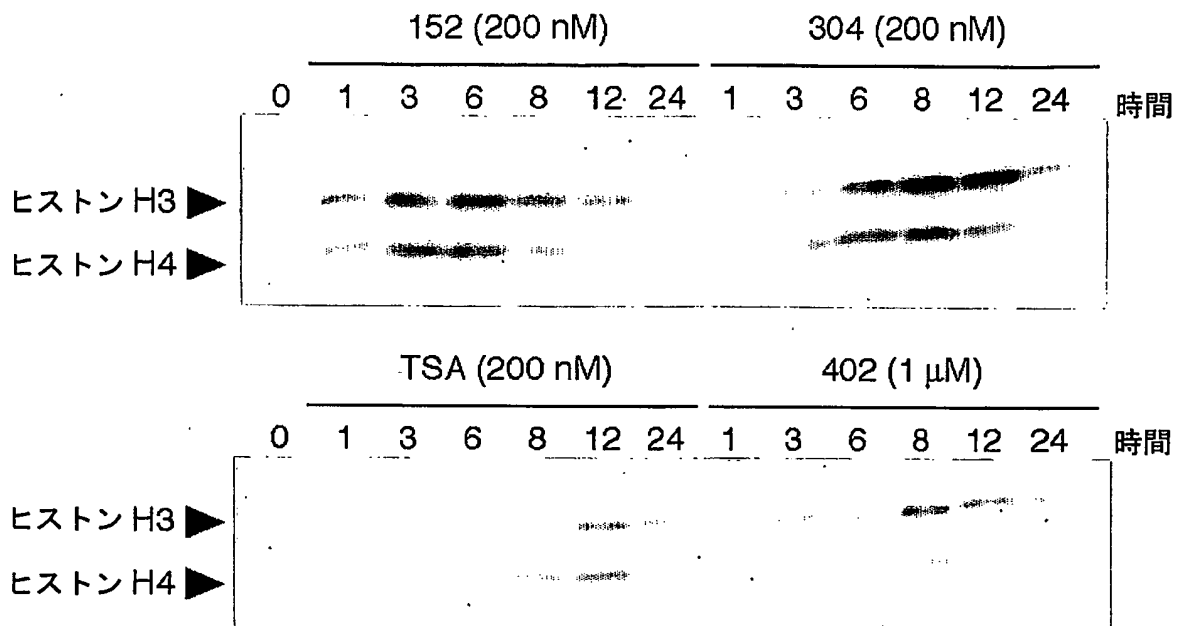


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/01859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K5/12, C12N9/99, A61K38/00, A61P17/00, A61P31/00,
A61P35/00, A61P37/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K5/12, C12N9/99, A61K38/00, A61P17/00, A61P31/00,
A61P35/00, A61P37/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/07042 A1 (MERCK & CO., INC.), 01 February, 2001 (01.02.01), & EP 1204411 A1 & JP 2003-505417 A	1-9
A	COLETTI S.L. et al., Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: structure-activity relationships of apicidin. Part 2. Bioorg.Med.Chem.Lett. 2001, Vol.11, No.2, pages 113 to 117	1-9
A	COLETTI S.L. et al., Design and synthesis of histone deacetylase inhibitors: the development of apicidin transition state analogs. Tetrahedron Letters 2000, Vol.41, No.41, pages 7837 to 7841	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 14 March, 2003 (14.03.03)	Date of mailing of the international search report 01 April, 2003 (01.04.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01859

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MEINKE P.T. et al., Synthesis of side chain modified apicidin derivatives: potent mechanism-based histone deacetylase inhibitors. Tetrahedron Letters 2000, Vol.41, No.41, pages 7831 to 7835	1-9
A	JP 2001-316283 A (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 November, 2001 (13.11.01), & CA 2317003 A1	1-9
A	WO 00/52033 A1 (JAPAN ENERGY CORP.), 08 September, 2000 (08.09.00), & EP 1174438 A1 & US 2002/0120099 A1 & JP 2000-256397 A	1-9
A	WO 00/21979 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 April, 2000 (20.04.00), & EP 1123309 A2 & JP 2002-527449 A	1-9

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl⁷ C07K 5/12, C12N 9/99, A61K 38/00, A61P 17/00, A61P 31/00, A61P 35/00, A61P 37/00, A61P 43/00</p>		
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl⁷ C07K 5/12, C12N 9/99, A61K 38/00, A61P 17/00, A61P 31/00, A61P 35/00, A61P 37/00, A61P 43/00</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>		
<p>国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>REGISTRY (STN), CA (STN)</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/07042 A1 (MERCK & CO., INC.) 2001.02.01 & EP 1204411 A1 & JP 2003-505417 A	1-9
A	COLETTI S. L. et al, Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: structure-activity relationships of apicidin. Part 2. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, Vol. 11, No. 2, p. 113-117	1-9
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	14. 03. 03	国際調査報告の発送日
		01.04.03
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4N 9152
日本国特許庁 (ISA/JP)	富永 みどり	
郵便番号100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	COLETTI S.L. et al, Design and synthesis of histone deacetylase inhibitors: the development of apicidin transition state analogs. Tetrahedron Letters 2000, Vol. 41, No. 41, p. 7837-7841	1-9
A	MEINKE P.T. et al, Synthesis of side chain modified apicidin derivatives: potent mechanism-based histone deacetylase inhibitors. Tetrahedron Letters 2000, Vol. 41, No. 41, p. 7831-7835	1-9
A	JP 2001-316283 A (藤沢薬品工業株式会社) 2001. 11. 13 & CA-2317003 A1	1-9
A	WO 00/52033 A1 (JAPAN ENERGY CORP.) 2000. 09. 08 & EP 1174438 A1 & US 2002/0120099 A1 & JP 2000-256397 A	1-9
A	WO 00/21979 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2000. 04. 20 & EP1123309 A2 & JP 2002-527449 A	1-9

THIS PAGE BLANK (USPT)